

STIC-ILL

NO

From: Steadman, David (AU1652)  
Sent: Tuesday, August 20, 2002 1:10 PM  
T: STIC-ILL  
Subject: literature request for 09/815,533

409009

Art Unit: 1652  
Office: 10D-04  
Mailbox: 10C-01 M3  
Case Serial #:09/815,533

Please provide the following references:

- 1) J Chromatogr 1990 Feb 23;525(2):297-306  
Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatographic cartridges.  
Hou KC, Zaniewski R.
- 2) Purification of high-molecular-weight and low-molecular-weight urokinase and kinetic study  
Sun, Tian-Xiao; Wang, Hong-Mei; Xu, Chang-Fa  
Shengwu Huaxue Zazhi (1997), 13(3), 344-349
- 3) Isolation, purification and comparative studies of certain properties of high- and low-molecular-weight urokinases of human urine.  
Sun, Leqin; Zhang, Hongzu; Zhu, Dexu  
Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (1984), 16(3), 303-6
- 4) J Biochem (Tokyo) 1981 Jul;90(1):225-32  
A comparative study of high molecular weight urokinase and low molecular weight urokinase.  
Nobuhara M, Sakamaki M, Ohnishi H, Suzuki Y.
- 5) Enzyme 1981;26(4):221-4  
Kinetic studies of three different molecular forms of urokinase for the activation of native human plasminogen.  
Toki N, Takasugi S, Sumi H.
- 6) Thromb Haemost 1983 Apr 28;49(2):91-5  
Purification of high molecular weight urokinase from human urine and comparative study of two active forms of urokinase.  
Shibatani T, Kakimoto T, Chibata I.
- 7) Thromb Haemost 1982 Jun 28;47(3):197-202  
Rapid isolation of high molecular weight urokinase from native human urine.  
Huber K, Kirchheimer J, Binder BR.
- 8) Chem Pharm Bull (Tokyo) 1981 Feb;29(2):463-71  
Comparative studies on two active enzyme forms of human urinary urokinase. I. Purification by serial column chromatography and homogeneity analyses of molecular weight and isoelectric point.  
Miwa N, Takayanagi H, Suzuki A.

Thank you,  
David J. Steadman  
Art Unit 1652  
CM1, 10D-04  
308-3934

CAS  
8/21

## 研究简报

Reprinted with permission by the Publisher. This material is protected by copyright and cannot be further reproduced or stored electronically without publisher permission and payment of a royalty fee for each copy made. All rights reserved.

p306

# 高分子量尿激酶和低分子量尿激酶的分 离、纯化及其某些性质的比较

孙乐琴 张洪祖 朱德煦  
(南京大学生物系)

就分子量而言尿激酶以两种形式存在<sup>[1,2]</sup>,即高分子量尿激酶(H-UK)和低分子量尿激酶(L-UK)。分子量分别为54,000和33,000。临床实践表明H-UK治疗血栓症的效果明显比L-UK好。动力学的研究也证明H-UK激活其天然底物溶纤酶原(PG)的米氏常数 $K_m$ 值仅为L-UK的一半<sup>[3]</sup>。因此找到分离纯化这两种尿激酶的有效方法,并比较它们的性质是颇有必要的。本文提供了一个分离和纯化两种分子形式尿激酶的方法,并比较了二者的热稳定性和等电聚焦性质。

## 材料和方法

1. 试剂 部分纯化的尿激酶由南大生化制剂厂提供。牛凝血酶为持田制药株式会社产品。牛纤维蛋白原为日本生化学工业株式会社产品。Ampholine为LKB产品。羟基磷灰石按A. Elisberg<sup>[4]</sup>方法制备。CM纤维素为Whatman产品。Amberlite-IRA 938树脂为美国BOHM and HARS产品。

2. 活性测定 基本按西崎恒夫纤维管法<sup>[5]</sup>测定。取0.5毫升UK(50~250 IU/毫升)置10×120毫米试管中,加入0.2毫升凝血酶(50 NIH/毫升),加入1.0毫升纤维蛋白原(8毫克/毫升),混匀后将试管置37°C恒温水浴,并放置直径为8.0毫米,重量为260~300毫克的尼龙小球,用停表精确记录小球下沉到管底的时间。

3. 等电聚焦电泳 参照Wrigly法<sup>[6]</sup>。胶浓度为10%,Ampholine浓度为0.7%,电压为150伏,正极溶液为0.2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,负极溶液为0.4% 乙醇胺。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按Weber法<sup>[7]</sup>。

## 结果和讨论

### 一、H-UK和L-UK的分离、纯化和鉴定

将部分纯化的尿激酶300毫克(比活10000 IU/毫克蛋白)溶于10升pH9.0的氨水

本文1982年8月31日收到。

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

中,加入固体 NaCl 调节电导到 23 mV/cm。将此溶液通过一预先用 0.01 M 磷酸缓冲液-0.2 M NaCl, pH 8.0 平衡的 Amberlite-IRA 938 型阴离子交换树脂柱(4×8.0 厘米),流速 2 升/小时。在 4°C 下收集流出液,流出液无色,比活为 17000 IU/毫克蛋白,活力回收 90%。将流出液用 1 M 醋酸调节 pH 到 4.2,并加蒸馏水调整电导到 15.6 mV/cm,进行羧甲基纤维素柱层析(2.0×4.0 cm)。柱预先用 0.1 M pH 4.2 醋酸缓冲液平衡,以每分钟 20 毫升的流速上样,然后用 0.1% 氨水-0.1 M NaCl 溶液洗脱。洗脱液比活为 80,000 IU/毫克蛋白,活力回收 80% 以上。

将比活为 80,000 IU/毫克蛋白的尿激酶溶液对 0.03 M pH 6.8 磷酸缓冲液透析后参照 White<sup>[1]</sup> 方法进一步用羟基磷灰石吸附柱层析分离两种尿激酶。羟基磷灰石柱(1.9×2.85 厘米),用相同缓冲液平衡。样品上柱后用 0.1 M 和 0.2 M pH 6.8 磷酸缓冲液分步洗脱,将 H-UK 和 L-UK 完全分开,结果见图 1。经羟基磷灰石柱层析分离后, H-UK 的比活为  $1 \times 10^6$  IU/毫克蛋白, L-UK 的比活无变化,再经过一次 Sephadex G-75 凝胶过滤(1.2×90 厘米)可将 L-UK 比活提高到  $1.8 \times 10^6$  IU/毫克蛋白。

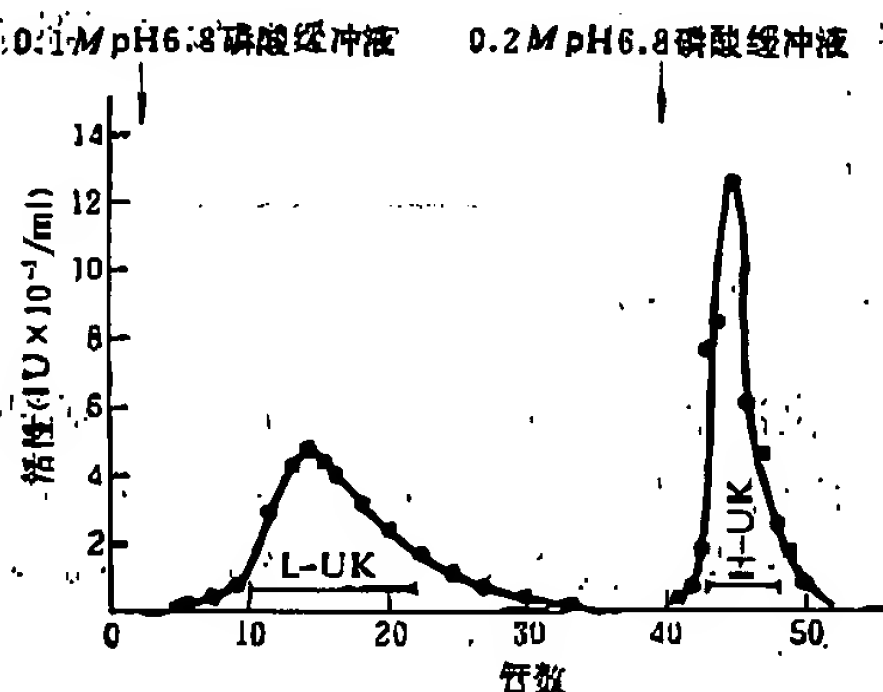


图1 H-UK 和 L-UK 在羟基磷灰石柱上的层析图谱

尿激酶为  $1.0 \times 10^6$  国际单位,对 0.03 M, pH 6.8 的磷酸缓冲液透析。柱 1.9×2.85 厘米,流速 1 毫升/分钟,每管收集 5 毫升;箭头表示磷酸缓冲液浓度的变化;尿激酶活性测定按纤维管法

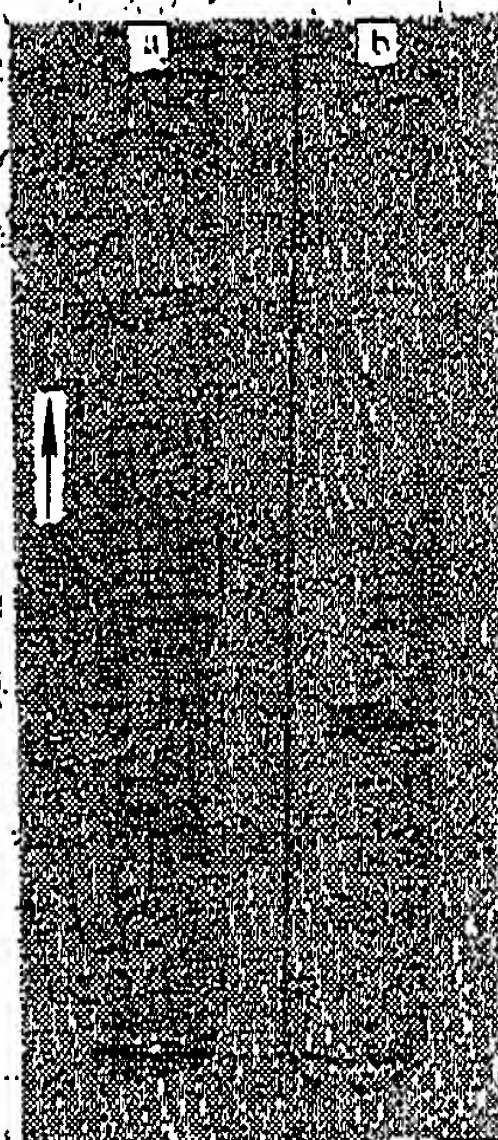


图2 纯化的 H-UK 和 L-UK 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
a) H-UK; b) L-UK

上述三步纯化方法操作简便、分离完全,回收率高,适宜于尿激酶的大规模的制备。通过阴离子树脂能脱色并除去热原。通过 OM 纤维素可将尿激酶浓缩 500 倍,比活提高 4 倍,通过羟基磷灰石,则将 H-UK 和 L-UK 完全分开。

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定证明为均一带,如图 2 所示。

## 二、两种尿激酶对温度的稳定性

高纯度的两种尿激酶制剂在 6 个温度(4°C~90°C)下,保温不同时间的活力变化如图 3 所示。两种 UK 对温度的稳定性明显不同。60°C 处理 2 小时, L-UK 仍保持 60% 的



活力,而 H-UK 则仅为 30% 左右。80°C 处理,两种尿激酶都完全失去活性,但 H-UK 的失活速度大于 L-UK

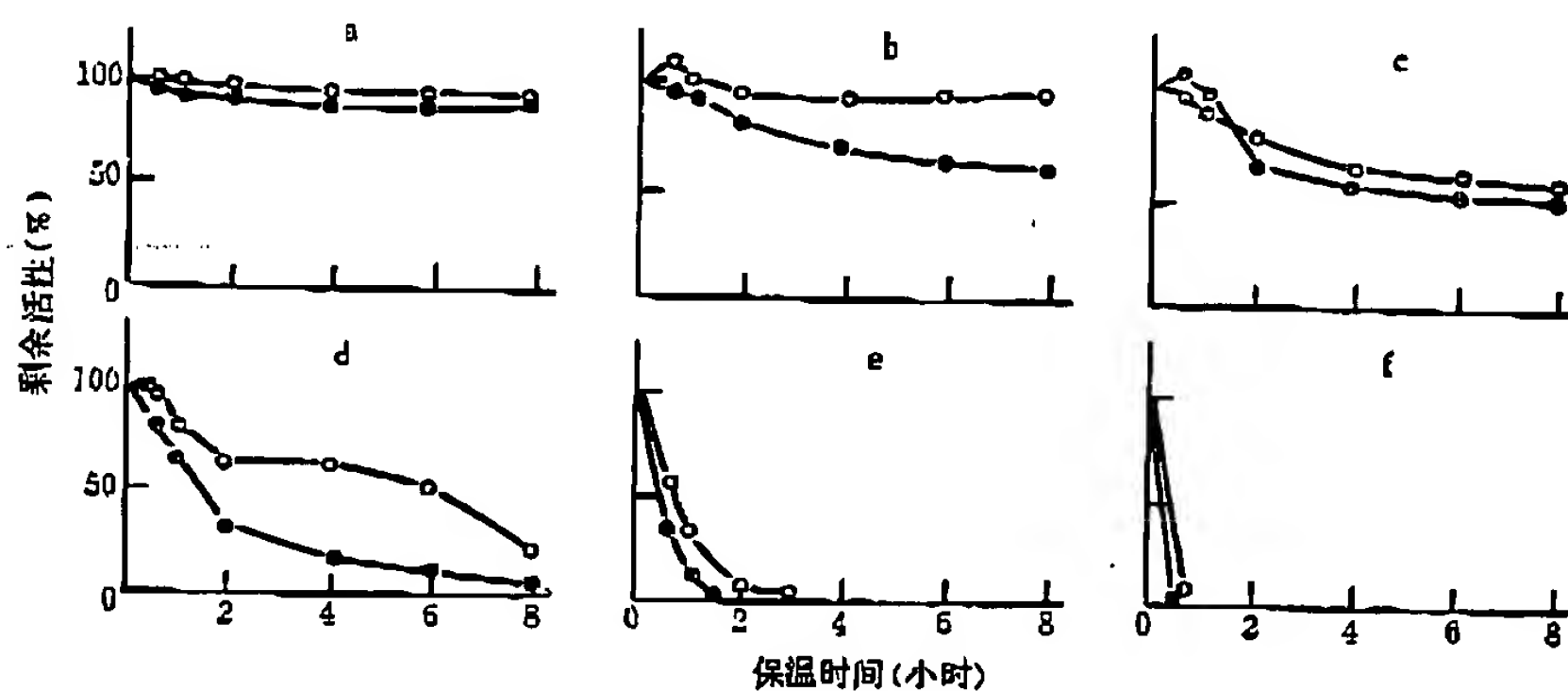


图 3 H-UK 和 L-UK 的热失活作用

H-UK 和 L-UK 溶于 0.1 M, pH 7.2 的磷酸缓冲液中,浓度均为 300 IU/毫升,不同温度保温;活性测定按纤维管法。●—●, H-UK; ○—○, L-UK  
保温温度: a) 4°C, b) 25°C, c) 37°C, d) 60°C, e) 80°C, f) 90°C

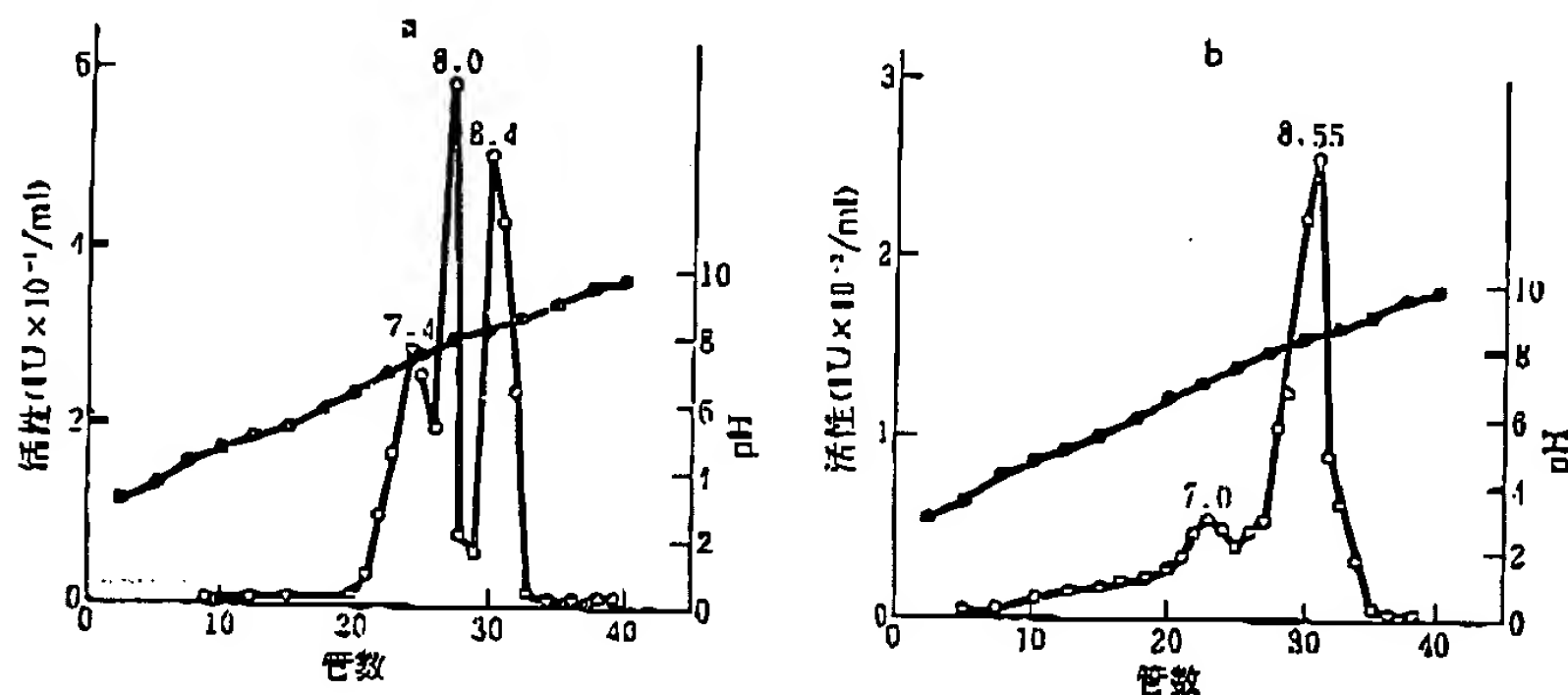


图 4 H-UK 和 L-UK 的等电聚焦图谱

Ampholine 浓度: 0.7% (pH 3.5~10.0); 胶浓度: 10%; 尿激酶活性测定按纤维管法  
a) L-UK b) H-UK

### 三、H-UK 和 L-UK 的等电聚焦分析

用 pH 3.5~10 的 Ampholine 进行等电聚焦, H-UK 在 pH 8.55 显示一单个峰,在 pH 7.0 处有一很小的活力峰。L-UK 则至少有 3 个活力峰, pI 分别为 7.4、8.0 和 8.4,如图 4 所示。pI 值和其它作者所得结果不尽相同<sup>[2,8,9]</sup>。鉴于不同作者用不同的纯化方法所得到的 pI 值各不相同,而且目前已用免疫分析表明 L-UK 是 H-UK 的降解产物<sup>[10]</sup>,因此我们认为所谓 L-UK 的亚型,并不是不同的基因产物,而是天然前体水解部位可能不同,或操作过程中人为造成的矫作物。

### 参 考 文 献

- [1] White, W. J. et al. The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine. *Biochemistry*, 1966, 5: 1-100

- [2] Seberano, M. E. et al. Purification and characterization of two forms of urokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 445, 763.
- [3] 朱德熙等: 两种分子形式尿激酶直接水解羧基-L-酪氨酸-P-硝基酚酞(OTN)的化学动力学. *南京大学学报*, 1979(4), 65.
- [4] Tiselius, A. et al. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 65, 132.
- [5] 西崎俊夫等: Studies on the determination of the potency of urokinase preparations. *医药品研究*, 1974, 5(3), 295.
- [6] Wrigley, C. W. Gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 1971, 22, 559, Academic Press, New York.
- [7] Weber, K. The reliability of molecular weight determinations of dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406.
- [8] Nobuhara, M. et al. A comparative study of high molecular weight urokinase and low molecular weight urokinase. *J. Biochem.*, 1981, 90, 225.
- [9] Miwa, N. et al. Comparative studies on two active enzyme forms of human urinary urokinase. *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29(2), 463.
- [10] Aasted, B. Immunochemical characterization of human plasminogen activators. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 666, 339.

Isolation, #

# high molecular weight and low molecular weight

# PURIFICATION, SEPARATION AND COMPARATIVE STUDIES OF CERTAIN PROPERTIES OF TWO ACTIVE ENZYMES OF HUMAN URINARY UROKINASE

SUN LEI QIN (ZHANG HONG ZU ZHU DE XU

(Department of Biology, Nanjing University)

Nanjing, China

ABSTRACT

Two forms of urokinase with molecular weights of 55,000 and 34,000 were purified and separated by ion exchange column chromatography followed by hydroxylapatite adsorption column chromatography. The specific activities of the high molecular weight urokinase (H-UK) and low molecular weight urokinase (L-UK) were  $1.0 \times 10^5$  IU/mg protein and  $1.8 \times 10^5$  IU/mg protein respectively. Both forms gave single bands in SDS electrophoresis.

Heat inactivation of H-uk and L-uk were investigated by measurements of plasminogen activator activity. L-uk was distinctly more stable than H-uk on heat treatment at around 60°C.

As judged by isoelectrophoresis, H-uk consisted of two subforms with pI values of 7.0 and 8.55, and L-uk, three subforms with pI values of 7.4, 8.0, and 8.4.

BEST AVAILABLE COPY